

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. K. Brand

**Circadianes Verhalten der
Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivität und
des Zyκλο-AMP-Gehaltes in den Lebern
extrem protein- oder kohlenhydratreich
ernährter Ratten**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Hans-Peter Zimmermann
aus Sulzbach-Rosenberg

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. K. Brand

**Circadianes Verhalten der
Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivität und
des Zyko-AMP-Gehaltes in den Lebern
extrem protein- oder kohlenhydratreich
ernährter Ratten**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Hans-Peter Zimmermann
aus Sulzbach-Rosenberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. K. Brand

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.1980

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Liste der Abkürzungen und Zeichen	1
1. Einleitung	3
2. Problemstellung	7
3. Material	9
3.1. Versuchstiere	9
3.2. Diäten	9
3.3. Fütterungsschema	10
3.4. Geräte	10
3.5. Chemikalien	10
4. Methoden	11
4.1. Zeitlicher Ablauf und Aufteilung der Versuchstiere	11
4.2. Gewinnung der Proben	12
4.3. Meßtechnische Angaben	13
4.4. Aktivitätsmessung der Fructose-1,6-bisphosphatase	14
4.4.1. Reaktionsprinzip	14
4.4.2. Aktivitätsmessung bei Substratsättigung und bei einer vorgegebenen Substratkonzentration	15
4.5. Zyklo-AMP-Bestimmung	18
4.6. Protein-Bestimmung	19
4.7. Statistik	20
5. Ergebnisse	21
5.1. 24-Stunden-Profile ernährungsphysiologischer Parameter	21
5.1.1. Körpergewichte	21
5.1.2. Magengewichte	21
5.1.3. Lebergewichte	23

	Seite
5.2. Circadianes Verhalten der Fructose-1,6-	
-bisphosphatase-Aktivität	24
5.3. 24-Stunden-Profil des Quotienten $v/v_{\max}$.	28
5.4. Circadianes Verhalten des Zyko-AMP - Ge -	
haltes	30
6. Diskussion	32
7. Zusammenfassung	45
Literaturverzeichnis	47

Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen und Zeichen

AMP	Adenosin-5'-monophosphat
d	Schichtdicke [cm]
E	dekadische Extinktion
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
ϵ_{λ}	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ [$l \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
FbP	Fructose-1,6-bisphosphat
FbPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
F_v	Vorverdünnungsfaktor
g	Erdbeschleunigung
G6P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)
HMG - CoA - -Reduktase	β -Hydroxy- β -methylglutaryl-Coenzym A -Reduktase
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
M	Mol pro Liter
NAD ⁺	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte Form
NADH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte Form
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduzierte Form
6-PG-DH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.44)
PGI	Phosphoglucose-Isomerase (EC 5.3.1.9)
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Tra-HCl	Triäthanolamin-Hydrochlorid
U	Unit: Enzymaktivität μ Mol Stoffumsatz pro Minute
v	Reaktionsgeschwindigkeit bei einer beliebigen Substratkonzentration ($v < v_{\max}$) [$\Delta E/\text{Min.}$]
$v_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung [$\Delta E/\text{Min.}$]
v_s	Schreibergeschwindigkeit
V_T	Gesamtvolumen eines photometrischen Ansatzes [ml]
v_p	Probenvolumen [ml]
Zyklo-AMP	zyklisches Adenosin-3'5'-monophosphat

1. EINLEITUNG

Jeder Organismus steht über seinen Stoffaustausch mit seiner Umwelt in einem stetigen Wechselspiel. Angefangen von der Stoffaufnahme über Umbauvorgänge bis hin zur Stoffausscheidung unterliegt die große Vielfalt der in der Zelle gleichzeitig ablaufenden Stoffwechselprozesse zahlreichen Kontroll- und Regelmechanismen. Nur ein kontrolliertes Nebeneinander von anabolen und katabolen Stoffwechselwegen ermöglicht die für das Leben nötige Aufrechterhaltung eines Systemgleichgewichtes in Form eines sich einstellenden Fließgleichgewichtes der Metabolitenkonzentrationen. Dieses Fließgleichgewicht ist für die jeweilige Stoffwechselanlage charakteristisch und besitzt hinsichtlich der Anpassung an veränderte Ernährungsbedingungen sinnvolle Steuerungsmechanismen. Da jeder Stoffumsatz in der Zelle enzymkatalysiert ist, bedeutet jede Regulation in biologischen Systemen letztlich die koordinierte Kontrolle der Katalysegeschwindigkeit der Enzyme. Die Zelle muß also fähig sein, bestimmte enzymatische Reaktionen eines Stoffwechselweges zu verlangsamen oder gar stillzulegen und gleichzeitig Reaktionen anderer Stoffwechselwege zu beschleunigen. Die Beschleunigung oder Hemmung eines Stoffwechselweges wird nicht durch Änderung der Katalysegeschwindigkeit aller Enzyme dieses Stoffwechselweges erreicht, sondern durch Aktivitätsänderung nur weniger, bestimmter Enzyme, den sogenannten Schlüsselenzymen oder auch Schrittmacherenzymen. Schrittmacherenzyme stehen an besonderen Stellen des Stoffwechsels.

Eine zentrale Bedeutung kommt in lebenden Organismen dem Kohlenhydratstoffwechsel zu. Die antagonistisch

arbeitenden Stoffwechselwege der Glykolyse und der Gluconeogenese unterliegen einer sorgfältigen Regulation. Betrachtet man den Gesamtablauf der Glykolysekette, so erkennt man reversible Reaktionen, die ohne weiteres für die rückläufige Synthese zur Verfügung stehen. Diesen reversiblen Reaktionen stehen drei Reaktionen gegenüber, die infolge ihrer Energietönung praktisch irreversibel verlaufen. Im einzelnen handelt es sich hierbei um die von den Enzymen Hexokinase, Phosphofructokinase und Pyruvatkinase katalysierten Reaktionen. Bei der Rückreaktion, der Gluconeogenese, werden diese drei glycolytisch irreversiblen Einzelreaktionen durch einen speziellen Stoffwechselweg umgangen, oder durch andere Enzyme katalysiert. Erstere Möglichkeit wird bei der Rückwandlung des Pyruvats beschritten mittels Pyruvatcarboxylase über Oxalacetat und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase zu Phosphoenolpyruvat. Der rückführende Schritt vom Fructose-1,6-bisphosphat zum Fructose-6-phosphat erfolgt mittels einer spezifischen Fructose-1,6-bisphosphatase auf hydrolytischem Wege, während die Bildung der freien Glucose durch eine spezifische Glucose-6-phosphatase erfolgt.

Die Fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) ist ein Schlüsselenzym in dem Sinne, daß seine Anwesenheit darüber entscheidet, ob ein Gewebe zur Gluconeogenese befähigt ist oder nicht. Das Enzym konnte bislang in Leber, Niere und in geringer Konzentration auch im Skelettmuskel nachgewiesen werden. Als eines der Kontrollenzyme der Gluconeogenese unterliegt das Enzym seinerseits vielfältigen Aktivations- und Inhibitionsmechanismen. Neben der Hemmung durch einen Überschuß seines

eigenen Substrates sind ferner die allosterische Kontrolle durch den Inhibitor AMP (1-4) bekannt, wie auch seine Aktivierung durch Chelatbildner wie Histidin (5), Citrat (6) und EDTA (7) sowie durch Oleat (8). Zur Diskussion stehen heute noch hormonelle (9-14) und nahrungsbedingte (12, 15-20) Beeinflussung der Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivität in Leberzellen. Untersuchungen zeigten, daß extrem kohlenhydratreiche Ernährung zu einer Verminderung, extrem proteinreiche Ernährung dagegen zu einer Erhöhung der Aktivität dieses Enzyms führt (24). Neuesten Berichten zufolge ist die Fructose-1,6-bisphosphatase der Rattenleber in vivo und in vitro phosphorylierbar (21). In Versuchen gelang es zu zeigen, daß die in Gegenwart einer Zyklo-AMP-abhängigen Proteinkinase ablaufende Phosphorylierung eine Steigerung der Aktivität um 40% erzielte. Gaben von Glucagon führten in Parallelversuchen zu einem vergleichbaren Aktivitätsanstieg (21).

Wenngleich über den molekularbiologischen Wirkungsmechanismus der Hormone noch wenig bekannt ist, so weiß man heute doch soviel, daß sie nach Bindung an spezifischen Rezeptoren Enzyme oder Enzymsysteme aktivieren, die Permeabilität der Zellmembran verändern oder über eine allosterische Inaktivierung des Repressors die Neubildung oder Mehrproduktion von Enzymen induzieren. Nach Sutherlands Adenylatcyclasetheorie (22) spielt das zyklische Adenosin-3',5'-Monophosphat (Zyklo-AMP) als Vermittler verschiedener Hormonwirkungen eine herausragende Rolle. Demnach verbindet sich in der Zellmembran ein Hormon mit seinem spezifischen Rezeptor zu einem Komplex, der seinerseits über eine Aktivitätssteigerung der membrangebundenen Adenylatcyclase die vermehrte Produktion

des Zyκλο-AMP bewirkt. Das so gebildete Zyκλο-AMP nimmt als "second messenger" der Hormonwirkung im intrazellulären Stoffwechsel eine zentrale Position ein.

2. PROBLEMSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob die in früheren Arbeiten in Rattenlebern gefundenen hohen beziehungsweise niedrigen Werte an Zyκλο-AMP (28) sowie der Enzymaktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase (24) bei extrem kohlenhydrat- und proteinreicher Ernährung einer circadianen Rhythmik unterliegen. Außerdem soll geprüft werden, ob die ernährungsbedingten hohen beziehungsweise niedrigen Enzymaktivitäten durch Nahrungsaufnahme noch kurzfristig verändert werden können. Anhand von 24-Stunden-Profilen dieser Parameter soll untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen möglichen circadianen Schwankungen der Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivität und des Zyκλο-AMP-Gehaltes besteht.

Im einzelnen umfaßt der Versuchsplan zur Bearbeitung dieser Problematik folgende Punkte:

1. Erstellen eines circadianen Aktivitätsprofils des Enzyms Fructose-1,6-bisphosphatase aus dem Cytosolpräparat von Rattenlebern.
2. Ermittlung eines 24-Stunden-Profils des Quotienten $v/v_{\max}$ der Fructose-1,6-bisphosphatase, wobei die Meßwerte v bei einer genau definierten Substratkonzentration gewonnen werden, während die Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit bei Substratsättigung mit Fructose-1,6-bisphosphat erfolgt.
3. Erstellen eines circadianen Profils des Zyκλο-AMP-Gehaltes der Lebern.
4. Ermitteln des 24-Stunden-Profils der Proteinmenge pro Gesamtleber.
5. Ermitteln des 24-Stunden-Profils der Magen- und Lebergewichte.

Der Versuchsplan sieht vor, alle Profile in Lebern von Ratten zu messen, die nach einer 72-stündigen Fastenperiode für den gleichen Zeitraum extrem kohlenhydratreich beziehungsweise extrem proteinreich ernährt wurden. Zur Vermeidung von Unstimmigkeiten der Meßergebnisse, hervorgerufen durch eventuell unterschiedliche individuelle Freßgewohnheiten der Tiere, erfolgte die Fütterung mit diesen extremen Diäten nicht ad libitum, sondern zu einem vorgegebenen Zeitintervall.

3. MATERIAL

3.1. Versuchstiere

Bei allen Versuchen wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet, die wir von der Firma Grassner aus Sulzfeld bezogen. Nachdem wir die Tiere zur Eingewöhnung 8 Tage in unserem Tierstall gehalten hatten, waren sie bei Versuchsbeginn 72 Tage alt. Für die Tierhaltung verwendeten wir Makrolon-Käfige vom Typ 3 (27 x 42 x 15 cm) und vom Typ 4 (38,5 x 59 x 20 cm) der Firma Ehret, wobei drei beziehungsweise sechs Ratten in einem Käfig mit Sägemehlspreu untergebracht wurden. Während die Futterzugabe nach einem später noch zu besprechenden Fütterungsschema erfolgte, stand den Tieren jederzeit Wasser aus Saugflaschen zur Verfügung. Im Tierstall wurden die Tiere einem konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus unterworfen mit Dunkelphase von 18 bis 6 Uhr. Ferner wurde die Temperatur bei 20 bis 25 °C konstantgehalten.

3.2. Diäten

Zur Anwendung kamen Fertigdiäten der Firma Altromin, Lage/Lippe (33):

- Haltungsdiät 1324
- Proteindiät: Altromin C 1009 mit minimalem Kohlenhydrat- und Fettgehalt
- Kohlenhydratdiät: Altromin C 1005 mit minimalem Protein- und Fettgehalt

Tabelle 1:

Diät	Gehalt der Hauptbestandteile in %		
	Protein	Fett	Kohlenhydrat
Haltungsdiät	25,5	5,6	68,9
Proteindiät	88,5	6,1	5,4
Kohlenhydratdiät	0,5	0,1	99,4

Sämtliche Diäten enthalten die optimale Zusammensetzung an Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen.

3.3. Fütterungsschema

Während der acht Tage bis Versuchsbeginn fütterten wir sämtliche Tiere mit der Haltungsdiät. Anschließend wurden die Tiere für drei Tage zum Fasten gesetzt. Lediglich Wasser stand ihnen weiter zur freien Verfügung. Nach dem Fasten bekam eine Hälfte der Ratten nur Proteindiät, die andere Hälfte Kohlenhydratdiät jeweils für 52 Stunden. Am Tage des Versuchsbeginns wurde den Tieren die bis dahin in nicht beschränkter Menge verabreichte Diät um 12 Uhr entzogen und von 20 bis 1 Uhr die entsprechende Diät wieder zugegeben.

3.4. Geräte

Homogenisator nach Potter und Elvehjem, Heidolph Typ 50113
Ultrazentrifuge: Beckmann L3-50, Rotor SW 27
Zentrifugen: Cyrofuge 20-3, Rotor 8780
Heraeus Christ Junior
Photometer: Zeiss PM 4 Spektralphotometer
Counter: Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer-Packard

3.5. Chemikalien

Die für die Versuchsdurchführung verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merk, die verwendeten Enzyme von der Firma Boehringer bezogen. Für die Radioimmunbestimmung des Zyklo-AMP wurde der Cyclic-AMP-Assay Kit der Firma Amersham, Buckinghamshire, England verwendet.

4. METHODEN

4.1. Zeitlicher Ablauf und Aufteilung der Versuchstiere

Zur Ausschaltung eventueller systematischer Fehlerquellen und der besseren Kontrolle unserer Versuchsergebnisse wegen, teilten wir unser Versuchsprogramm in zwei getrennte Versuchsserien ein. Im Abstand von sechs Wochen führten wir beide Versuchsserien an je 102 Ratten unter sonst völlig identischen Bedingungen durch.

Das Gewicht der Ratten wurde zu drei Zeitpunkten kontrolliert:

- 1.) am Beginn der 3-tägigen Fastenperiode
- 2.) nach Beendigung der Fastenperiode unmittelbar vor Wiederauffüttern mit der jeweiligen Diät
- 3.) unmittelbar vor der Tötung

Durchgehend von 18 Uhr des ersten Versuchstages bis 18 Uhr des darauffolgenden Tages wurden in 2-stündigen Abständen die Ratten in Sechsergruppen von jeweils drei mit Kohlenhydratdiät und drei mit Proteindiät ernährten Ratten getötet. Wir entnahmen ihnen Blut- und Leberproben und bestimmten das Gewicht der den getöteten Tieren entnommenen Mägen. Am dritten Versuchstag wurden die restlichen 24 Ratten dieser Versuchsreihe zu den Zeitpunkten 19, 21, 23 und 1 Uhr getötet, nachdem zuvor das Fütterungsschema dieser Rattengruppe den der Ratten vom Vortage derart angeglichen wurde, daß identische Bedingungen bezüglich der Fasten- und Wiederauffütterungsdauer vorherrschten.

4.2. Gewinnung der Proben

Nachdem die Ratten in Dreiergruppen mit Äther narkotisiert und anschließend gewogen wurden, entnahmen wir ihnen durch Abschneiden des Schwanzes Blut aus den Schwanzgefäßen. Das ausströmende Blut wurde in Liquemin-Röhrchen aufgefangen und im Anschluß daran zur Gewinnung des Plasmas für die spätere Insulinbestimmung sofort abzentrifugiert. Zur Gewinnung von Lebergewebe wurde nach Eröffnen der Bauchhöhle ein Gefrierstopp der Leberprobe in situ durchgeführt. Hierbei wurde eine zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlte Spezialzange verwendet. Die so entnommenen, 300 bis 400 mg schweren, schockgefrorenen Leberproben wurden in kleine, mit flüssigem Stickstoff gefüllte Szintillationsgefäße abgefüllt und unter Verschuß bei -70°C aufbewahrt. Das restliche Lebergewebe wurde sorgfältig herauspräpariert und in eisgekühltem Homogenisationspuffer ^{*)} gewaschen. Anschließend wurde das in kleine Stücke geschnittene Lebergewebe in 4°C kaltem, frischem Homogenisationspuffer eingewogen und unter Eiskühlung in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert (1500 Upm; Heidolph-Rührwerk). Das Volumen des Rohhomogenisats wurde auf das vierfache des eingewogenen Lebergewichtes eingestellt. Zur Gewinnung des Lebercytosols wurde das Homogenisat 70 Minuten lang bei $100\,000 \times g$ und einer Temperatur von 4°C in der Ultrazentrifuge L3-50 zentrifugiert. Das so gewonnene Cytosol wurde bis zur späteren Bestimmung der Aktivität des Enzyms Fructose-1,6-bisphosphatase (FbPase) nebst des Proteingehaltes bei 4°C aufbewahrt. Für die Zyκλο-AMP-

^{*)} Zusammensetzung: 10 mM Tra-HCl-Puffer, 10 mM EDTA- Na_2
50 mM NaF, pH = 7,6

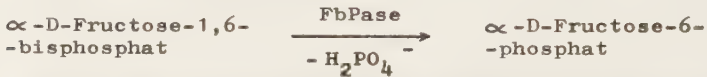
-Bestimmung mußten die vorübergehend bei -70°C aufbewahrten Leberfrierstopps aufbereitet werden. Hierzu wurden die noch gefrorenen Leberproben in eisgekühlten, 0,5 M Perchlorsäure enthaltenden Bechergläsern eingegeben und sofort mit dem Homogenisator nach Potter und Elvehjem unter Eiskühlung homogenisiert (1 000 Upm; Heidolph-Rührwerk). Im Anschluß daran wurden die Homogenisate bei $8\,000 \times g$ 15 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert (Cyrofuge 20-3, Rotor 8780). Der Überstand wurde mit Kalilauge neutralisiert, mit aqua bidest auf 10 ml aufgefüllt und bis zur endgültigen Zyκλο-AMP-Bestimmung bei -25°C weggefroren.

4.3. Meßtechnische Angaben

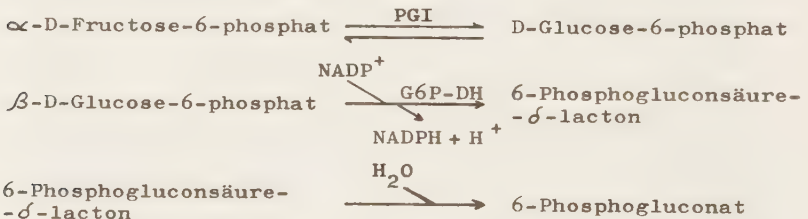
Für die Einstellung des pH-Wertes der für die Meßreihen benötigten Lösungen verwendeten wir ein mit Standardpufferlösungen (pH: 4,0; 7,0; 10,0) geeichtes pH-Meßinstrument (Metrohm). Die Enzymaktivitäten wurden nach dem von O. Warburg entwickelten optischen Test bestimmt, basierend auf dem NAD(P)/NAD(P)H-System als spektrophotometrischem Indikator ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$, molarer Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^6 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^2$). Die Messung selbst erfolgte in einem Zeiss PM4 Spektralphotometer unter Verwendung von Halbmikro-Küvetten (Fa. Hellma; $d = 20 \pm 0,01 \text{ mm}$) bei einer konstanten Temperatur von 25°C . Sämtliche Meßergebnisse wurden über einen mit dem Photometer gekoppelten Potentialschreiber (Servogor S von Goerz Electro) aufgezeichnet. Alle Einzelwerte wurden aus Zweifach-, zum Teil aus Dreifachbestimmungen gemittelt.

4.4. Aktivitätsmessung der Fructose-1,6-bisphosphatase

4.4.1. Reaktionsprinzip



Die Bestimmung der Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase (FbPase, EC 3.1.3.11) erfolgte über einen gekoppelten optischen Test. Das gebildete D-Fructose-6-phosphat wurde über das Enzym Phosphoglucose-Isomerase (PGI) in einer nachfolgenden enzymatischen Umsetzung mit der Indikatorreaktion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) gekoppelt:



Der stöchiometrischen Umsetzung entsprechend wird pro Mol hydrolysiertem α -D-Fructose-1,6-bisphosphat (FbP) ein Mol NADPH gebildet.

Die FbPase entfaltet ihr Aktivitätsoptimum im Bereich zwischen pH 7,4 bis 7,6.

Mg²⁺-Ionen vermögen die katalytische Aktivität zu stimulieren, während Zn²⁺-Ionen, welche direkt am Enzymprotein gebunden sind (23), eine starke Inhibition der Aktivität bewirken, die allerdings durch Chelatbildner wie EDTA, Histidin oder Citrat aufgehoben werden kann (24).

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen verwendeten wir deshalb bei der Versuchsdurchführung einen Spezialpuffer mit einem pH-Wert von 7,6 (s. 4.4.2.).

4.4.2. Aktivitätsmessung bei Substratsättigung und bei einer vorgegebenen Substratkonzentration

Die Bestimmung der FbPase-Aktivitäten erfolgte nach der von Weigand angegebenen Methode (24, 25) in einer leicht modifizierten Form. Dadurch konnten die Geschwindigkeit v bei einer definierten FbP-Konzentration und die Maximalgeschwindigkeit $v_{\max}$ bei Substratsättigung in einem Reaktionsansatz gemessen werden.

Meßansatz:

Lösungen (pH 7,6)	Volumen (μ l)	Endkonz.
Tra-HCl (25 mM)	750	19,43 mM
MgCl ₂ (2,5 mM)		1,94 mM
EDTA (1,25 mM)		0,97 mM
NADP (11,4 mM)	50	0,54 mM
PGI (140 U/ml)	50	659,44 mU/ml
G6P-DH (175 U/ml)		
	Reagenz	
	Hilfsenzyme	824,31 mU/ml

1. Start:

Probe ⁺)	100
----------------------	-----

2. Start:

FbP (100 μ M)	50	5,18 μ M
---------------------	----	--------------

3. Start:

FbP (2 mM)	15	31,09 μ M
--------------	----	---------------

Ansatzvolumen: 965 μ l

(Meßbedingungen siehe 4.3.)

⁺) Vorverdünnung der Cytosole mit 0,1 M Tra (pH 7,6)

Kohlenhydratdiät: 16-fach

Proteindiät: 41-fach

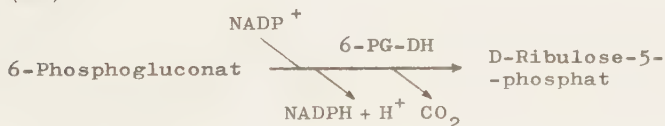
Für die nach dem in 4.4.1. beschriebenen Reaktionsprinzip verlaufende spektrophotometrische Messung wurden die Cytosole in 0,1 M Tra-HCl (pH 7,6) vorverdünnt. Für die Kohlenhydratdiät wurde der Vorverdünnungsfaktor 16 gewählt, gegenüber dem Wert 41 für die Protein-diät. Als Äquivalent der photometrisch zu bestimmenden Größe v beziehungsweise $v_{\max}$ diente die zeitliche Änderung der Extinktion. Die Werte $\Delta E/\text{Min.}$ wurden graphisch aus den Schreiberprotokollen durch Anlegen einer Geraden an die sigmoidal verlaufenden Umsatz-Zeit-Kurven ermittelt.

Den Messungen der Enzymaktivitäten vorangehend, mußte bei der Kohlenhydratdiät in einer ersten Startreaktion erst abgewartet werden, bis im Cytosol vorhandenes Substrat der Hilfsenzyme abreagiert hatte. Bei der Protein-diät trat eine solche Komplikation nicht auf. Nach Zugabe der Probe (1. Start) ließ sich keine zeitliche Änderung der Extinktion feststellen.

In einem ersten Schritt der Enzymaktivitätsmessungen wurde die Größe v bei einer bestimmten, in allen Versuchsreihen gleichbleibenden Konzentration an FbP ermittelt (2. Start). In unserem Fall wählten wir eine FbP-Konzentration, die im Bereich des K_m -Wertes liegt. Wegen des sehr niedrig liegenden K_m -Wertes (24) war es nötig, die Empfindlichkeit der Messung durch Verwendung von Küvetten mit 2 cm Schichtdicke sowie Erweiterung des Meßbereiches am Schreiber des Spektralphotometers durch Verstärken der Extinktionssignale ($E: 0,0 - 0,2$) zu steigern. Der besseren Auswertung wegen wurden die Umsatz-Zeit-Kurven bei einer Schreibergeschwindigkeit von $6 \text{ cm}/\text{Min.}$ aufgezeichnet.

Für die nachfolgende Messung der FbPase-Aktivität unter $v_{\max}$ -Bedingungen (3. Start) erwies sich die Vorga-

be des Meßbereiches E: 0,0 - 0,5 und eine Schreibergeschwindigkeit von 3 cm/Min. als vorteilhaft. Wie aus zahlreichen Vorversuchen zu ersehen war, reichen $30 \mu\text{M}$ FbP aus, um die maximale Geschwindigkeit zu erzielen. Während bei der Bestimmung von v nur der steile sigmoidale Anstieg der Umsatz-Zeit-Kurve von Bedeutung war, interessierte bei der v_{max} -Messung der gesamte Kurvenverlauf einschließlich des flacheren linearen Anteils. Dieser langsamere Anstieg rührt daher, daß in den Cytosolen automatisch das Enzym 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PG-DH) mitbestimmt wurde. Dieses Enzym bewirkt über eine nachfolgende Umsetzung des bei der FbPase-Messung entstandenen 6-Phosphogluconat mit NADP^+ einen weiteren geringen Anstieg der Extinktion (24).



Die Auswertung der Meßergebnisse der FbPase-Aktivitätsbestimmung bei Substratsättigung erfolgte über die oben beschriebene graphische Ermittlung der zeitlichen Änderung der Extinktionen, wobei $4E_1/\text{Min.}$ der Summe der Aktivitäten der Enzyme FbPase und 6-PG-DH und $4E_2/\text{Min.}$ der 6-PG-DH-Aktivität entspricht. Unter Berücksichtigung des vorgegebenen Meßbereiches $E=0,5$ und der gewählten Schreibergeschwindigkeit $v_s = 3 \text{ cm/Min.}$ errechnet sich in der vom Lambert-Beerschen-Gesetz abgeleiteten Gleichung die Enzymeinheit U bezogen auf ein ml Cytosol wie folgt:

$$\frac{U}{\text{ml Cytosol}} \left[\frac{\mu\text{Mol FbP}}{\text{Min.} \cdot \text{ml}} \right] = \frac{(\Delta E_1 - \Delta E_2) / \text{Min.} \cdot 0,5 \cdot 3}{\epsilon_{340} \cdot d \cdot 10^{-3}} \cdot \frac{v_T}{v_P} \cdot F_v$$

mit: v_T = Gesamtvolumen des photometrischen Ansatzes (ml)

v_P = Probenvolumen des vorverdünnten Cytosols (ml)

F_v = Vorverdünnungsfaktor des Cytosols

Die Enzymeinheit U (=Unit) gibt die unter Standardbedingungen in einer Minute umgesetzten $\mu\text{Mole FbP}$ an. Für die anschließende Berechnung U/Leber mußte neben dem Verdünnungsfaktor des Rohhomogenats noch das Lebergewicht berücksichtigt werden. Desweiteren wurde unter Zuhilfenahme der getrennt ermittelten Werte des cytosolischen Proteingehaltes der Leber die spezifische Aktivität des Enzyms FbPase bestimmt.

Um den Quotienten $v/v_{\max}$ berechnen zu können, bedurfte es erst der Angleichung der bei unterschiedlichen Meßbereichen und unterschiedlichen Schreibergeschwindigkeiten ermittelten $\Delta E/\text{Min.}$ -Werten. In die Berechnung des Quotienten $v/v_{\max}$ gingen nur solche korrigierten $\Delta E/\text{Min.}$ -Werte ein, die aus dem anfänglich steilen Kurvenstück beider Umsatz-Zeit-Kurven entnommen wurden.

4.5. Zyκλο-AMP-Bestimmung

Die Zyκλο-AMP-Bestimmung erfolgte radioimmunologisch nach einer Methode, wie sie im Prinzip von Gilman (26) und Tovey (27) beschrieben wurde (28). Die Grundlage dieses speziellen Meßverfahrens bildet die kompetitive Bindung von Tritium-markiertem Zyκλο-AMP und nichtmarkiertem Zyκλο-AMP an ein spezifisches Bindungsprotein. Bei dieser Meßreihe wurde der Cyclic-AMP-Assay Kit der

Firma Amersham-Buchler, Braunschweig, verwendet.

0,05 ml des Homogenisatüberstandes wurden mit 0,1 ml Bindungsproteinlösung und 0,05 ml gelöstem Tritium-Zyklo-AMP-Tracer, gepuffert in 0,05 M Tris/EDTA-Puffer, bei pH 7,5 und 4 °C zwei Stunden lang inkubiert. Durch Zugabe von 0,1 ml Kohlesuspension und anschließender Zentrifugation (Heraeus Christ Junior) erfolgte eine Trennung des an das Bindungsprotein gebundenen Zyklo-AMP vom freien Nukleotid. Für die Messung der Radioaktivität in 0,2 ml Überstand im Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer der Firma Packard kam eine Bray'sche Lösung zur Anwendung. Über eine zuvor getrennt ermittelte lineare Standardkurve erfolgte schließlich die Berechnung des Zyklo-AMP-Gehaltes der einzelnen Proben.

4.6. Protein-Bestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes aus dem Cytosol erfolgte mittels der Biuret-Methode: 0,5 ml Wasser, 0,2 ml 3 M Trichloressigsäure (TCA) und 50 µl (Cytosol proteinreich ernährter Ratten) beziehungsweise 75 µl (Cytosol kohlenhydratreich ernährter Tiere) Probe wurden in einem 2 ml fassenden Plastikzentrifugenglas gemischt. Nach 30 Minuten wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 1 ml Biuret-Reagenz ⁺) gelöst und nach 10 Minuten die Extinktion im Zeiss Photometer bei 546 nm gegen Reagenz als Leerwert gemessen.

⁺) Biuret-Reagenz: 1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
6,0 g Na-Tartrat $\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
300 ml 2,5 M NaOH ad 1000 ml

4.7. Statistik

Alle Einzelwerte wurden aus Zweifach-, zum Teil aus Dreifachbestimmungen gemittelt. Streuungen von maximal 10 % wurden toleriert. Die Meßwerte von jeweils sechs Ratten pro Zeitpunkt werden als Mittelwerte $\pm$ SEM (SEM = Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes) dargestellt ($\bar{x} \pm$ SEM).

5. ERGEBNISSE

5.1. 24-Stunden-Profile ernährungsphysiologischer Parameter

5.1.1. Körpergewichte

Das Körpergewicht unterliegt als ernährungsphysiologische Größe mitunter großen Schwankungen. Um sich einen groben Überblick über die Gewichtsveränderungen der Versuchstiere verschaffen zu können, wurden, wie bereits unter 4.1 beschrieben, die Körpergewichte der Ratten an drei Zeitpunkten kontrolliert. Während der 3-tägigen Fastenperiode fiel das Körpergewicht aller Tiere um circa 17% ab, was einer Abnahme von 50 g entspricht. Das durchschnittliche Gewicht betrug zu dieser Zeit nur noch 242 ± 18 g. In der Wiederauffütterungsphase stiegen dann allerdings die Körpergewichte in Abhängigkeit von der jeweils gefütterten Diät wieder an. So verzeichneten wir unter dem Einfluß der Proteindiät einen Anstieg um 21 g auf 263 ± 20 g gegenüber einer geringen Zunahme von nur 3 g bei den mit Kohlenhydratdiät gefütterten Ratten auf einen Endwert von 245 ± 20 g. Damit lagen beide Rattengruppen in ihren Körpergewichten immer noch unter den zu Versuchsbeginn verzeichneten Werten (mit Proteindiät gefütterte Ratten: -10%; mit Kohlenhydratdiät gefütterte Ratten: -16%).

5.1.2. Magengewichte

Wie aus nebenstehender Abbildung zu ersehen ist, kann man für die Magengewichte der Ratten zum Zeitpunkt der Tötung, unabhängig von der jeweils gefütterten Diät, große Unterschiede feststellen. Ausgehend von Werten

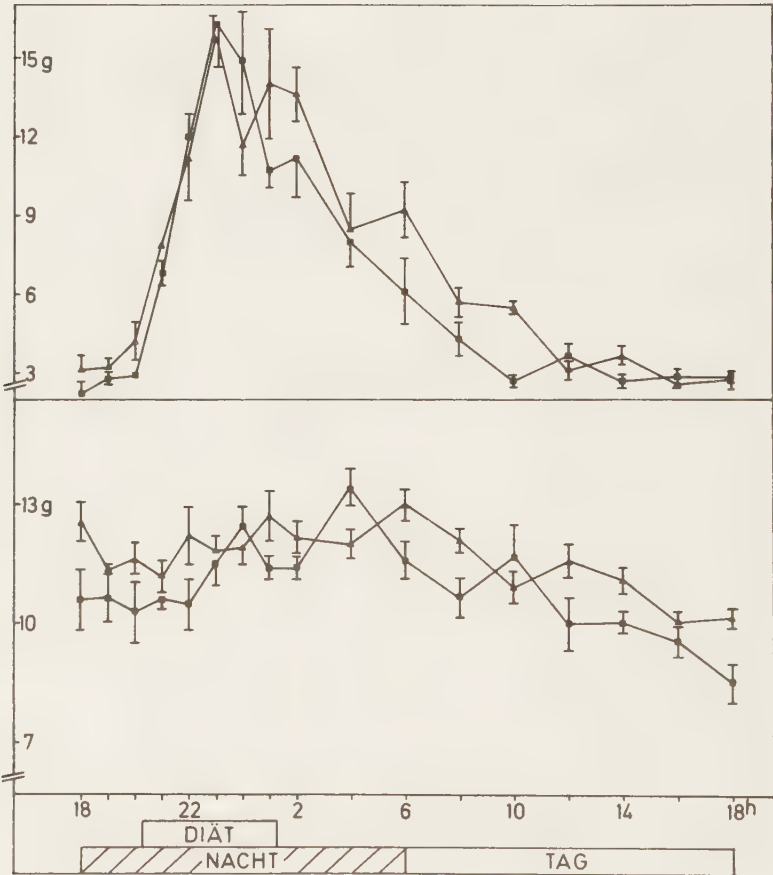


Abb. 1:

oben: 24-Stunden-Profil der Magengewichte

unten: 24-Stunden-Profil der Lebergewichte

-▲- Proteindiät

-■- Kohlenhydratdiät

Mittelwerte $\pm$ SEM aus sechs Beobachtungen pro Meßpunkt.

Wenn keine Abweichung vom Mittelwert eingetragen ist,

liegt SEM innerhalb der Zeichen.

um 3 g vor Futterzugabe steigen die beiden Kurven der Magengewichte kontinuierlich an bis zum Erreichen der Höchstwerte von circa 16 g zum Zeitpunkt 23 Uhr. Verliefen bis dahin beide Kurven noch annähernd parallel, so ändert sich das Bild nach 23 Uhr. Im Vergleich zu den mit Proteindiät ernährten Ratten fällt die Kurve bei den mit Kohlenhydratdiät ernährten Ratten vom Höchstwert relativ schnell ab und erreicht zwei Stunden vor der Vergleichsdiät zum Zeitpunkt 10 Uhr bereits wieder seinen Ausgangswert.

5.1.3. Lebergewichte

Die Betrachtung der Lebergewichtskurven zeigt im Hinblick auf die verschiedenen Diäten ein unterschiedliches Bild. Während die Lebergewichte der mit Proteindiät ernährten Ratten nur gering um den Wert 12 g streuen und lediglich im letzten Drittel des 24-Stunden-Profiles abfallende Tendenz zu erkennen geben, unterliegen die Lebergewichte der anderen Rattengruppe weitaus größeren Schwankungen. Gegen Mitte der Fütterungsphase zeichnet sich ein allmählicher Anstieg der Lebergewichte ab. Von einem Ausgangswert von etwas über 10 g nimmt das Lebergewicht bis zum höchsten Wert um annähernd 3 g zu. Nach diesem Gipfel bei 4 Uhr sinkt das Lebergewicht allerdings im weiteren Tagesverlauf wieder auf einen Endwert von etwa 9 g ab. Über den gesamten Meßzeitraum betrachtet fallen die Lebergewichte bei der Kohlenhydratgruppe im Mittel um etwa 10% ab, gegenüber einem Abfall von rund 15% bei der Vergleichsdiät.

5.2. Circadianes Verhalten der Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivität

Die Auswertung der Meßergebnisse der Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivitätsbestimmung erfolgte unter Berücksichtigung verschiedener Bezugsgrößen. So wird in Abb. 2 im oberen Diagramm der zeitliche Verlauf der pro Gramm Leber gemessenen FbPase-Aktivität dargestellt, während im unteren Diagramm der Verlauf der in der gesamten Leber gemessenen Enzymaktivität aufgezeichnet wird. Schließlich mußte für das in Abb. 3 unten dargestellte Tagesprofil der spezifischen Aktivität der FbPase als eine weitere Bezugsgröße der Gehalt an löslichem Protein im Lebercytosol bestimmt werden.

Bei der Betrachtung des ersten Diagramms (Abb. 2) erkennt man, daß die Werte der pro Gramm Leber gemessenen FbPase-Aktivität zwei annähernd horizontal verlaufende Kurven ergeben, wobei die mit Proteindiät gefütterten Ratten gegenüber der Vergleichsgruppe rund doppelt so hohe Aktivitätsraten aufweisen. Weichen die Werte der Proteingruppe nur gering vom Mittelwert 9 Units/g Leber ab, so liegt der Vergleichswert der Kohlenhydratgruppe bei knapp 5 Units/g Leber . Lediglich in der zweiten Hälfte des 24-Stunden-Profils zeichnet sich bei den mit Kohlenhydrat ernährten Tieren ein sehr langsamer Anstieg der Kurve gegen den Endwert 6 Units/g Leber ab. Dieser Anstieg geht, wie ein Vergleich mit der Lebergewichtskurve (Abb. 1) für diesen Zeitraum zeigt, mit einer stetigen Abnahme der Lebergewichte bei der Kohlenhydratdiät einher.

Aus diesem Grund ergibt sich bei diesen mit Kohlenhydrat ernährten Ratten im zweiten Diagramm (Abb. 2 unten) für die Gesamtleberaktivität wieder ein der Zeitachse

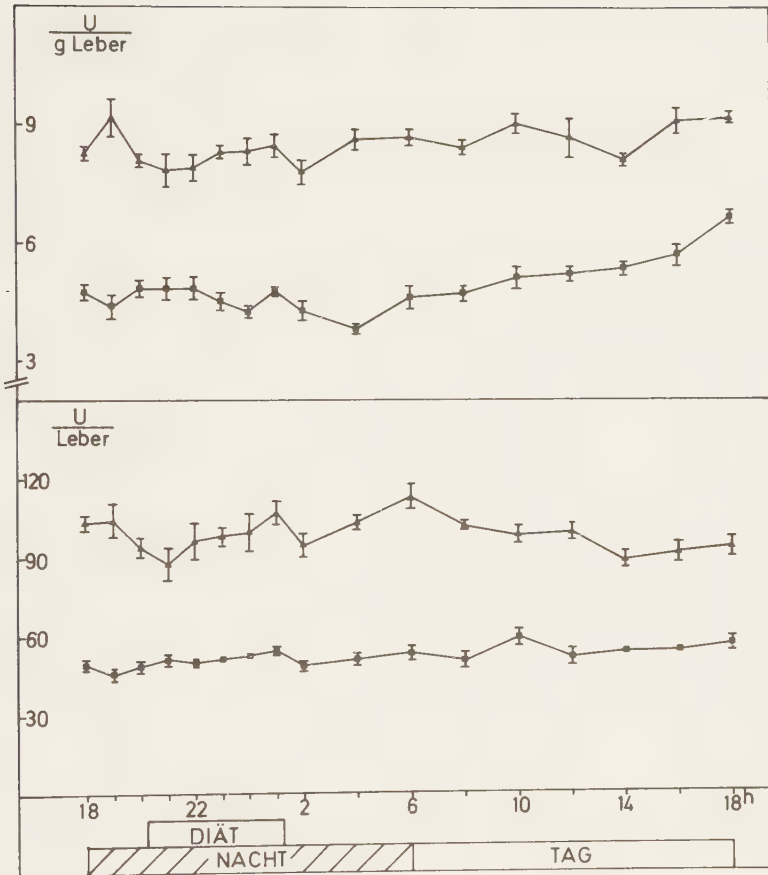


Abb. 2:

oben: 24-Stunden-Profil der Aktivität des Enzyms FbPase bezogen auf ein Gramm Leber
 unten: 24-Stunden-Profil der FbPase-Aktivität pro Gesamt-leber

-▲- Proteindiät -■- Kohlenhydratdiät

Mittelwerte $\pm$ SEM aus sechs Beobachtungen pro Meßpunkt.
 Wenn keine Streuung vom Mittelwert eingetragen ist, liegt SEM innerhalb der Zeichen.

nahezu paralleles Kurvenbild. An dem Verlauf der Proteinkurve hingegen tritt auch nach Berücksichtigung der Lebergewichte keine Änderung ein. Abgesehen von einzelnen Schwankungen der Werte erkennt man in Annäherung das Bild einer waagrecht verlaufenden Geraden. Aus dem Vergleich der Mittelwerte beider FbPase-Aktivitätskurven resultiert als Ergebnis eine annähernd doppelt so hohe Umsatzkapazität an Fructose-1,6-bisphosphat in den Lebern proteinernährter Ratten. In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies circa 100 Units bei mit Proteindiät ernährten Ratten gegenüber 50 Units bei kohlenhydraternährten Tieren.

Wie bereits eingangs erwähnt, wurde als dritte Bezugsgröße für die Angabe der Enzymaktivität der Gehalt an löslichem Protein im Lebercytosol ermittelt. In Abb. 3 (oben) wurden die Ergebnisse der Messung in einem Diagramm zusammengefaßt. Im Gegensatz zu den relativ kleinen Schwankungen der Meßwerte bei den kohlenhydraternährten Tieren um einen Mittelwert von circa $800 \text{ mg}^{\text{Prot}} / \text{Leber}$ zeigt die Kurve der mit Proteindiät gefütterten Ratten ein differenziertes Bild. Mit Beginn der Diätzugabe steigt der Proteingehalt der Lebern von knapp 1200 mg auf über 1300 mg an. Nach Erreichen dieses Höchstwertes um 6 Uhr morgens fällt die Kurve langsam wieder auf ihren Ausgangswert ab.

Die Kurven der spezifischen Aktivität der FbPase (Abb. 3 unten) zeigen demgegenüber wieder ein untereinander ähnliches Verhalten. Unter dem Einfluß der Protein- wie auch der Kohlenhydratdiät kommt es zur Ausbildung eines neuen "steady state". Allerdings liegen die Werte der spezifischen Aktivität bei den Proteintieren um ein Drittel höher als bei den mit Kohlenhydrat ernährten Ratten.

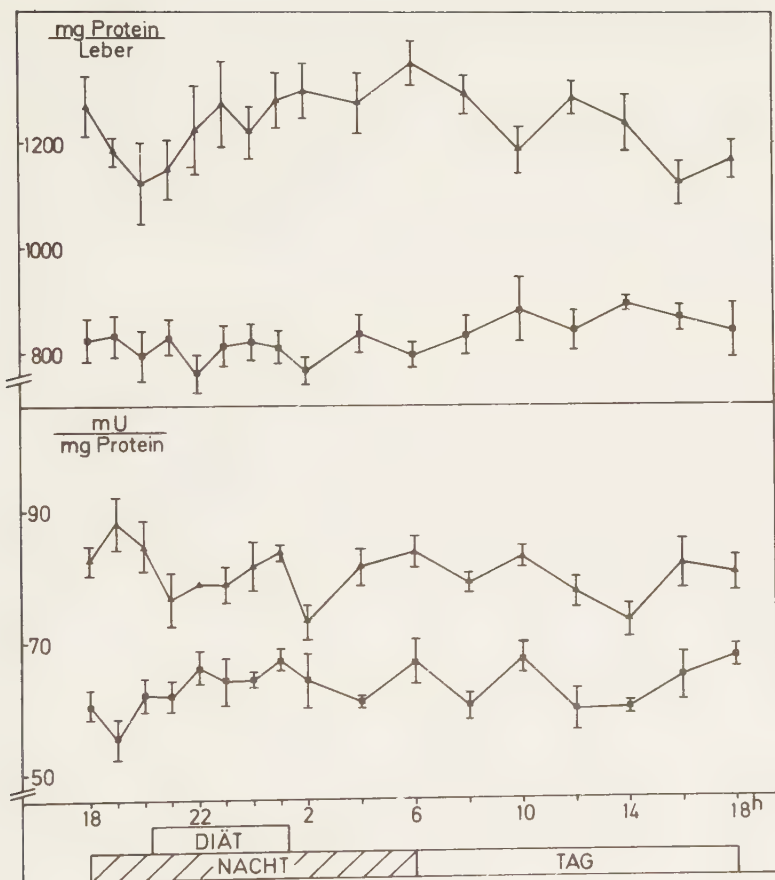


Abb. 3:

oben: 24-Stunden-Profil des cytosolischen Proteingehaltes der Leber

unten: 24-Stunden-Profil der spezifischen Aktivität der FbPase

-▲- Proteindiät

-■- Kohlenhydratdiät

Mittelwerte $\pm$ SEM aus sechs Beobachtungen pro Meßpunkt.

Wenn keine Streuung vom Mittelwert eingetragen ist, liegt SEM innerhalb der Zeichen.

5.3. 24-Stunden-Profil des Quotienten $\frac{v}{v_{\max}}$

In Abb. 4 werden die Ergebnisse des über kurzfristige Änderungen der Affinität des Enzyms zum Substrat Aufschluß gebenden Quotienten $\frac{v}{v_{\max}}$ graphisch aufgetragen. Der Quotient berechnete sich aus dem Verhältnis der bei der Enzymmessung ermittelten Umsatzgeschwindigkeit bei einer konstant vorgegebenen Substratkonzentration zu der unter Substratsättigung sich einstellenden maximalen Geschwindigkeit.

Die den verschiedenen Diäten entsprechenden Kurven zeigen hinsichtlich ihres Verlaufes keine nennenswerten Unterschiede. Sie verlaufen beide annähernd parallel zur Zeitachse. Lediglich bei Betrachtung der Mittelwerte läßt sich bei der Kohlenhydratdiät ein Abfall von circa 10% gegenüber der Proteindiät feststellen. ⁺) So beträgt der Quotient $\frac{v}{v_{\max}}$ bei der Proteindiät im Mittel 0,52 verglichen mit dem durchschnittlichen Wert von 0,42 bei den Kohlenhydrattieren.

⁺) Diese Betrachtung erfolgte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Substratkonzentrationen bei der v-Messung; so betrug die FbP-Konzentration bei der Proteindiät 5,18 μM , gegenüber nur 4,87 μM bei der Kohlenhydratdiät.

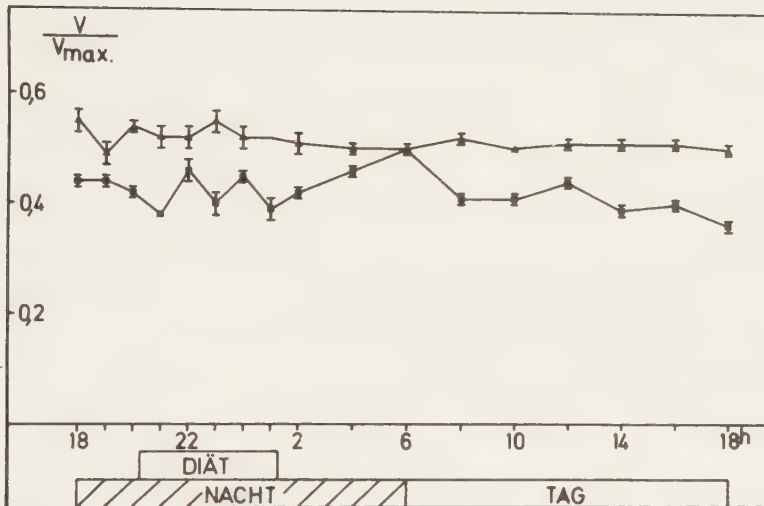


Abb. 4:

24-Stunden-Profil des Quotienten v/v_{max}

- ▲ - Proteindiät - ■ - Kohlenhydratdiät

Mittelwerte $\pm$ SEM aus sechs (Proteindiät) beziehungsweise drei (Kohlenhydratdiät) Beobachtungen pro Meßpunkt.

Wenn keine Streuung vom Mittelwert eingetragen ist, liegt SEM innerhalb der Zeichen.

5.4. Circadianes Verhalten des Zyκλο-AMP-Gehaltes

In Abb. 5 wird der zeitliche Verlauf des Zyκλο-AMP-Gehalts in Abhängigkeit von den Parametern "Gramm Leber" und "Gesamtleber" wiedergegeben. Wie aus dem Kurvenverlauf im oberen Diagramm ersichtlich wird, steigt bei der Proteingruppe binner der ersten zwei Stunden nach Mitternacht, nach sechs Stunden annähernd konstanten Verhaltens, die in einem Gramm Leber enthaltene Menge an c-AMP um ein Drittel ihres Ausgangswertes auf den Höchstwert von $1,6 \text{ nMol}$ an. Nach Erreichen dieses Maximalwertes gegen 2 Uhr dauert es weitere acht Stunden bis das Ausgangsniveau von $1,2 \text{ nMol/g Leber}$ wieder erreicht wird. Demgegenüber erlangt der Anstieg bei den kohlenhydraternährten Tieren, obwohl er bereits eine Stunde früher einsetzt, erst um 4 Uhr seinen ebenfalls um ein Drittel höheren Gipfelwert von $1,15 \text{ nMol/g Leber}$. Anschließend fällt die Kurve vergleichsweise rasch wieder auf ihren Ausgangswert von $0,8 \text{ nMol/g Leber}$ zurück.

Der Kurvenverlauf im unteren Diagramm unterscheidet sich nur unwesentlich von dem vorhergehenden. Beide Kurven steigen nach anfangs fast konstanten c-AMP-Konzentrationen unterschiedlich schnell auf ihren Maximalwert an. Während die Konzentration des c-AMP in den Lebern der proteinreichernährten Ratten sehr rasch von 13 nMol auf fast 19 nMol steigt, erfolgt in den Lebern der mit Kohlenhydratdiät gefütterten Ratten eine langsame Zunahme um 7 nMol c-AMP auf über 15 nMol . Was den zeitlichen Beginn des Kurvenanstiegs, die Lage der beiden Maxima sowie den Abfall der Kurve zurück auf die Anfangswerte anbelangt, treten im unteren Diagramm Parallelen zum oberen auf.

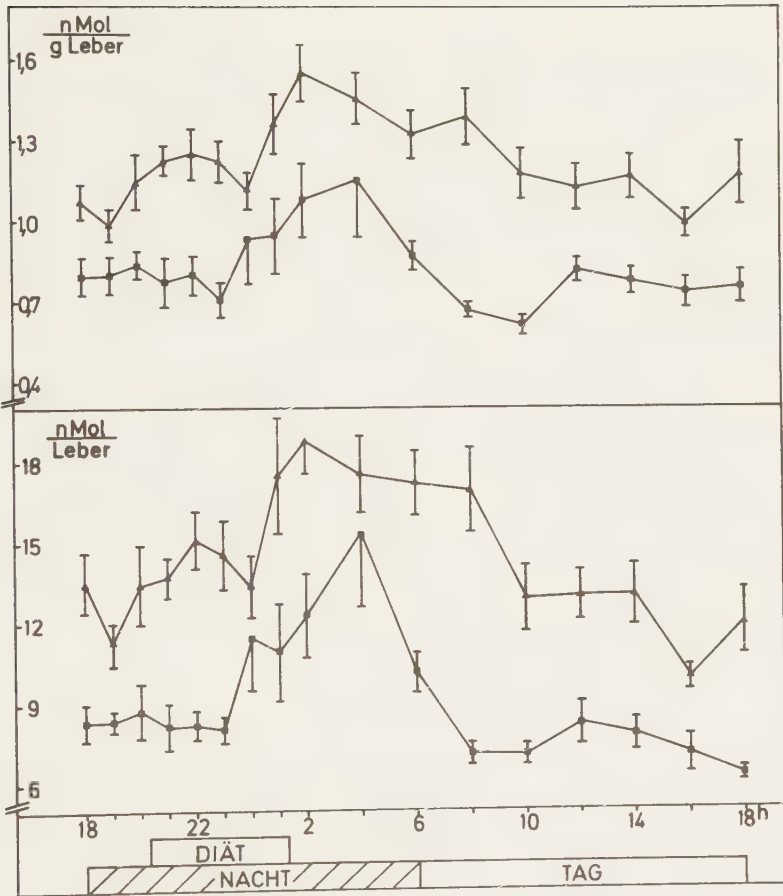


Abb. 5:

oben: 24-Stunden-Profil des Zyklo-AMP-Gehaltes bezogen auf ein Gramm Leber

unten: 24-Stunden-Profil des Zyklo-AMP-Gehaltes pro Gesamtleber

-▲- Proteindiät

-■- Kohlenhydratdiät

Mittelwerte $\pm$ SEM aus sechs Beobachtungen pro Meßpunkt.

6. DISKUSSION

Im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit steht die grundlegende Frage, ob und gegebenenfalls in welchem Ausmaß spezifisch-katalytische Eigenschaften bestimmter Enzyme des Glukosestoffwechsels dem Einfluß extremer Ernährungs- und Stoffwechselsituationen unterliegen. Im Rahmen der den Organismen eigenen Anpassungsfähigkeit an veränderte Umweltbedingungen führt nach extrem kohlenhydrat- beziehungsweise proteinreicher Ernährung die sich einstellende glycolytische beziehungsweise gluconeogenetische Stoffwechsellaage zu Veränderungen bestimmter Enzymaktivitäten. In einer vorangegangenen Arbeit wurde am Beispiel der Fructose-1,6-bisphosphatase (FbPase) der Nachweis erbracht, daß die in den Lebern von Ratten nach 3-tägiger Fastenperiode und anschließender Wiederauffütterung mit extrem kohlenhydrat- beziehungsweise proteinreicher Nahrung gemessenen unterschiedlichen Aktivitäten der FbPase auf Änderungen der zellulären Enzymkonzentrationen zurückgeführt werden können (24).

In Ergänzung dieser Ergebnisse sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die ernährungsbedingt veränderte Aktivität der FbPase circadianen Schwankungen unterliegt. Unser besonderes Interesse galt dabei der Frage, ob die bei proteinreicher Diät gefundenen hohen beziehungsweise die bei kohlenhydratreicher Diät beobachteten niedrigen Enzymaktivitäten durch Nahrungsaufnahme noch kurzfristig verändert werden können. Die Versuchsbedingungen waren identisch mit denen in der vorhergehenden Arbeit. Lediglich das Ernährungsmodell wurde dahingehend modifiziert, daß die Tiere nach 3-tägigem Fasten in der anschließenden 3-tägigen Wieder-

auffütterungsphase ihre extrem kohlenhydrat- beziehungsweise proteinreiche Diät nicht ad libitum erhielten, sondern zu einem vorgegebenen, ihrem Freßverhalten weitgehend angepaßten Zeitintervall.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ferner noch das circadiane Verhalten des Zyκλο-AMP-Gehaltes in den Lebern dieser extrem ernährten Ratten untersucht werden, um zu klären, ob eine Korrelation zwischen der Konzentration dieses Effektors und eventuellen circadianen Schwankungen der FbPase-Aktivität besteht.

Um sich einen Überblick über das circadiane Verhalten der jeweiligen Parameter verschaffen zu können, wurden die in ein- beziehungsweise zweistündigen Abständen gewonnenen Meßwerte in einem 24-Stunden-Profil zusammengestellt. In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf Enzyme und Hormone, die circadianen Schwankungen unterworfen sind. Edwards und Gould (29) konnten nachweisen, daß in den Lebern mit Normaldiät gefütterter Ratten das Schrittmacherenzym der Cholesterinbiosynthese, die β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), einer circadianen Rhythmik unterworfen ist. Auch bei den Enzymen des Glukosestoffwechsels wurde dieser Nachweis erbracht, wie am Beispiel der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase ersichtlich wird (30, 31). Auffällig war bei diesem aus den Lebern mit Normaldiät gefütterter Ratten gewonnenen gluconeogenetischen Schlüsselenzym die enge Beziehung der tageszeitlichen Aktivitätsschwankungen zu der Nahrungsaufnahme. Wie bereits angedeutet, wurde das circadiane Verhalten auch an einzelnen Hormonen untersucht. Trump (28) wies an elf Wochen alten Ratten bei Fütterung mit Normaldiät nach, daß die gefundenen In-

sulinkonzentrationen im Blut einer circadianen Rhythmik unterliegen. Ebenso erbrachte er in parallel verlaufenden Untersuchungen für das als Mittler der Hormonwirkung fungierende Zyκλο-AMP den Nachweis signifikanter tageszeitlicher Konzentrationsunterschiede. Allerdings ist dieses Tagesprofil des hepatozellulären Zyκλο-AMP-Gehaltes wegen des vierstündigen Abstandes zweier aufeinanderfolgender Meßpunkte nur unvollkommen. Um sich einen genauen Überblick über das Ausmaß der circadianen Schwankungen verschaffen zu können, war es deshalb nötig, die zeitlichen Abstände der Meßpunkte einzuengen.

Vor der Beantwortung der zentralen Frage nach möglichen circadianen Veränderungen der FbPase-Aktivität und des Zyκλο-AMP-Gehaltes wurde zuerst geprüft, in welchem Maße extrem geänderte Ernährungssituationen Einfluß auf die Stoffwechsellage nehmen. Zur Charakterisierung der durch extrem kohlenhydrat- beziehungsweise proteinreicher Diät erzeugten glycolytischen beziehungsweise gluconeogenetischen Stoffwechsellage wurden folgende ernährungsphysiologische Parameter ermittelt: Körpergewicht, Magen- und Lebergewicht (Abb.1) sowie der Proteingehalt der Leber (Abb.3).

Die während der 3-tägigen Fastenperiode erfolgende Abnahme der Körpergewichte um 17% stimmt mit den Ergebnissen anderer Untersucher überein (28, 32). Wurde diese Abnahme um circa 50 g bei beiden Diätgruppen festgestellt, so war die nach Wiederauffütterung gefundene durchschnittliche Gewichtszunahme recht verschieden mit Werten von 3 g bei den mit Kohlenhydratdiät gefütterten Ratten gegenüber 21 g bei der Proteindiät. Insgesamt betrachtet sind die verzeichneten Anstiege der

Körpergewichte charakteristisch für die durch die extreme Ernährung definierte Stoffwechsellage. Da Eiweiß als Stickstoffträger des Körpers praktisch den gesamten Stickstoff des Körpers enthält, muß eine extrem kohlenhydratreiche Ernährung mit minimalsten Proteinanteilen (33) zu einer negativen Stickstoffbilanz und damit zu einer Reduzierung des körperlichen Eiweißbestandes führen. Exzessive Zufuhr von Kohlenhydrat vermag nach Wiederauffüllen der Glykogenvorräte den beginnenden Gewichtsverlust nicht zu verhindern (28, 32). Im Gegensatz dazu führt die Ernährung mit extremer Proteindiät (33) zu einer kontinuierlichen Zunahme des Körpergewichtes, die auch noch über den dritten Tag der Wiederauffütterung zu verfolgen ist (28, 32). Die nötige Energiezufuhr erfolgt über einen verstärkten Abbauder gefütterten Proteine für die Gluconeogenese.

Zur Dokumentation des Freßverhaltens der Tiere wurden die Magengewichte zum Zeitpunkt der Tötung bestimmt und in einem Diagramm (Abb. 1) aufgezeichnet. Die Magengewichtskurven beider Diäten unterscheiden sich hinsichtlich ihres Verlaufes nur unwesentlich. Nach Futterzugabe steigen die Magengewichte binnen vier Stunden auf mehr als das 5-fache ihres Ausgangswertes an, um dann wieder langsam auf ihren Anfangswert von 3 g abzusinken. Wie aus der Lage und Höhe des Maximalwertes ersichtlich wird, ist die aufgenommene Nahrungsmenge unabhängig von der jeweils gefütterten Diät. Außerdem läßt sich durchaus eine indirekte Bestätigung unseres, dem natürlichen Freßverhalten der nachtaktiven Ratten angepaßten, Fütterungsschemas ablesen. Denn obwohl den Tieren bis 1 Uhr das Futter zur Verfügung stand, hatten sie die Nahrungsaufnahme bereits zwei Stunden zuvor abgeschlossen.

Die Ergebnisse aus der Untersuchung der Lebergewichte (Abb. 1) zeigen je nach der gefütterten Diät ein unterschiedliches Bild. Bei den mit Kohlenhydratdiät gefütterten Ratten steigen die Lebergewichte zwei Stunden nach Futterzugabe langsam um circa 3 g an. Nach Erreichen des Höchstwertes von 13,4 g zum Zeitpunkt 4 Uhr fallen die Gewichte wieder auf einen um 2 g unter dem Ausgangswert liegenden Endwert von knapp 9 g ab. Dagegen zeigen die Gewichte der Vergleichsdiät ein den Nahrungseinflüssen gegenüber indifferentes Verhalten mit geringen Schwankungen um einen durchschnittlichen Wert von 12 g und nur gegen Ende des Meßzeitraums einen langsam einsetzenden Abfall. Reichliche Zufuhr von Kohlenhydraten führt beiden Tieren zu einer raschen Speicherung von Glukose in Form von Glykogen. Dieses Reservekohlenhydrat wird im tierischen Organismus neben der Muskulatur nur noch in der Leber in nennenswertem Umfang gespeichert und unterliegt in Abhängigkeit von der Stoffwechsellage und Ernährung raschen Schwankungen, wie am Beispiel der Lebergewichtskurve der mit Kohlenhydratdiät ernährten Ratten ersichtlich wird. Für die Auswertung der Meßergebnisse war die Untersuchung des circadianen Verhaltens insofern von Bedeutung, als diesbezügliche Schwankungen sich auf die zelluläre Metabolitenkonzentrationen auswirken mußten. Die Bezugsgröße g Leber erweist sich deshalb für eine detaillierte Betrachtung der Versuchsergebnisse nur bedingt geeignet. Der Aussagewert der auf die Gesamtleber bezogenen Ergebnisse ist demgegenüber höher einzustufen, da er die Organkapazität der zu bestimmenden FbPase-Aktivität beziehungsweise den Organgehalt an Zyklo-AMP wiedergibt.

Der Gehalt an löslichem Protein in den Lebern der Ratten wurde im Hinblick auf die Verwendung als Bezugsgröße für die zu messende FbPase-Aktivität bestimmt. Wie die Ergebnisse aus Abb. 3 zeigen, bleibt in den Lebern der mit Kohlenhydratdiät ernährten Tiere der cytosolische Proteingehalt mit einem Durchschnittswert von etwas über 800 mg Protein / Leber nahezu konstant, während sich in der Vergleichsgruppe ein deutlicher Einfluß der Proteindiät auf den cytosolischen Eiweißgehalt zeigt. Kurze Zeit nach der Futterzugabe erhöht sich der Eiweißspiegel der Leber bis zum Erreichen des höchsten Wertes um 6 Uhr morgens um mindestens 150 mg. Anschließend fällt er langsam wieder auf sein Ausgangsniveau von fast 1200 mg Protein / Leber zurück. Proteinreiche Nahrung führt über Proteinhydrolyse im Digestionstrakt zu einem starken Anstieg des freien-Aminosäure-Spiegels im Pfortaderblut. Im Systemkreislauf tritt eine entsprechende Erhöhung jedoch nicht auf. Das ist darauf zurückzuführen, daß der Großteil der resorbierten Aminosäuren in die Leber aufgenommen wird. In diesem Zentralorgan des Intermediärstoffwechsels wird ein Teil der Aminosäuren unter Ammoniakabspaltung in Ketocarbonsäuren umgewandelt, während der andere Teil für die Biosynthese spezifischer Leber- und Plasmaproteine verwendet wird. Alleinige Zufuhr von Kohlenhydraten befähigt wegen des gestörten Stickstoffgleichgewichtes nicht zur Synthese körpereigenen Proteins. Der cytosolische Eiweißspiegel in den Lebern dieser Tiere bleibt unverändert.

Wie aus den beiden Tagesprofilen in Abb. 2 ersichtlich wird, unterliegen die aus dem Lebercytosol unter $v_{\max}$ -Bedingungen bestimmten Aktivitäten der FbPase unab-

hängig von der jeweils gefütterten Diät keinen nennenswerten Schwankungen. Lediglich bei den mit Kohlenhydratdiät gefütterten Tieren läßt sich in der zweiten Hälfte des Tagesprofils ein leichter Anstieg der auf ein Gramm Leber bezogenen Enzymaktivitäten erkennen. Der Grund dafür ist ein mit der Aufzehrung der Glykogenvorräte einhergehender Abfall der Lebergewichte. In dessen findet dieser scheinbare Anstieg der Aktivität nach Berücksichtigung des Gesamtlebergewichtes keine Bestätigung mehr. Die Aktivitäten bezogen auf Gesamt-leber zeigen bei beiden Diäten in Annäherung das Bild zweier der Zeitachse paralleler Geraden. In guter Übereinstimmung mit den von Weigand (24) gefundenen Werten ist die in den Lebern proteinreich ernährten Ratten bestimmte Umsatzkapazität an Fructose-1,6-bisphosphat (FbP) mit einem durchschnittlichen Wert von circa 100 U doppelt so hoch wie in der Vergleichsdiät. Wie ferner aus dem unteren Diagramm der Abb. 3 entnommen werden kann, vermag auch eine Berücksichtigung des cytosolischen Proteingehaltes der Lebern das Kurvenbild nicht wesentlich zu verändern. Allerdings liegen die Werte der spezifischen Aktivität der FbPase bei den proteinernährten Tieren mit einem Durchschnittswert von $80 \text{ mU} / \text{mg Protein}$ um ein Drittel höher als bei den mit Kohlenhydratdiät ernährten Tieren. Extreme Kohlenhydrat- beziehungsweise Proteinerneuerung vermag das intrazelluläre Stoffwechselgeschehen dahingehend zu beeinflussen, daß die Aktivitäten bestimmter Schlüsselenzyme des Intermediärstoffwechsels mehr oder minder großen Schwankungen unterliegen (24, 32). Steigen beispielsweise unter dem Einfluß extrem kohlenhydratreicher Nahrung die glycolytischen Aktivitäten (32, 34), so sind es unter dem Einfluß hochproteinhaltiger Diät

vorwiegend die protein-katabolen Aktivitäten (35-38). Mit dem letzteren einhergehend konnte auch eine Beeinflussung gluconeogenetischer Enzyme beobachtet werden (24). Über die Gluconeogenese wird die Versorgung des Organismus mit Glukose auch dann sichergestellt, wenn Kohlenhydrate nicht in ausreichenden Mengen mit der Nahrung aufgenommen werden. Bei reiner Proteinernährung erfolgt diese Neubildung von Glukose aus katabolen Aminosäuren. Nach Transaminierung und Desaminierung in der Leber bilden die glucoplastischen Aminosäuren entweder Pyruvat oder Zwischenprodukte des Citratcyclus, die in Oxalacetat überführt und anschließend zu Glukose umgewandelt werden können. Der FbPase als eines von dreien, diesen Reaktionsweg Gluconeogenese katalysierenden Schlüsselenzymen, kommt im Hinblick auf die gluconeogenetische Stoffwechselregulation eine zentrale Bedeutung zu. Pontremoli et al (39, 40) konnten in Kaninchenlebern zeigen, daß eine experimentell bedingte gluconeogenetische Stoffwechsellaage, wie zum Beispiel nach längerem Fasten oder bei Vorliegen eines künstlichen Alloxan-Diabetes, zu einem Aktivitätsanstieg der FbPase führt. Diesen Untersuchungen zufolge vermitteln lysosomale Proteinasen die gluconeogenetische Wirkung des Glukagons und der Glucocorticoide über eine bislang nicht in alle Einzelheiten geklärte strukturelle und katalytische Modifizierung des Enzyms. Weiterhin finden sich in der Literatur Hinweise auf eine Zyκλο-AMP-abhängige Stimulierung der FbPase-Aktivität. Chatterjee und Datta (41) konnten die von Clark et al (42) geäußerte Vermutung bestätigen, wonach die spezifische Wirkung des Glukagons auf das gluconeogenetische Enzym FbPase indirekt über das Zyκλο-AMP als Vermittler erfolgt. Die gefundene Zyκλο-AMP-abhängige

Aktivierung der FbPase steht in Übereinstimmung mit den von Riou et al (21) gefundenen Untersuchungsergebnissen. Dieser Forschergruppe gelang in den Lebern von Ratten der Nachweis einer in vivo stattfindenden Phosphorylierung der FbPase, die mit einer Aktivitätssteigerung von 40 % einhergeht. Das auf den Glukagonreiz hin vermehrt synthetisierte Zyklo-AMP aktiviert eine Proteinkinase, die durch ATP-abhängige Phosphorylierung zur Aktivierung der FbPase führt.

Auf der Erkenntnis beruhend, daß derartige enzymkatalysierte Modifizierungen auch in vitro ablaufen können, wurde in dieser Untersuchung zur Bestimmung der hepatozellulären FbPase-Aktivität ein spezieller Homogenisationspuffer (s. 4.2.) verwendet. EDTA- und NaF-Zusatz verhindern durch Inhibition von Proteinkinasen beziehungsweise Phosphatasen eine nachträgliche Verfälschung der cytosolischen Enzymaktivitäten. Eine zusammenfassende Betrachtung der ermittelten Enzymaktivitäten gibt keinen Hinweis auf kurzfristig durch Nahrungsaufnahme veränderte Aktivitäten. Nach 3-tägiger Wiederauffütterung mit extrem kohlenhydrat- und proteinreicher Diät zeigen die unter $v_{\max}$ -Bedingungen bei Substratsättigung gemessenen Aktivitäten der FbPase keine signifikanten tageszeitlichen Schwankungen. Kurzfristige allosterische Regulationen der Enzymaktivität vom V-Typ können in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Desgleichen kann, wie die Ergebnisse der $v/v_{\max}$ -Bestimmungen (Abb. 4) zeigen, eine, die Enzymaffinität zum Substrat ändernde, postsynthetische Modifizierung der FbPase ausgeschlossen werden. Außer einer um circa 10% höheren Affinität bei den mit Proteindiät gefütterten Ratten, ließen sich keine kurzfristigen ernährungsbedingten Schwankungen der $v/v_{\max}$ -Werte nach-

weisen. Offensichtlich liegen die oben beschriebenen kovalenten Modifizierungen durch Phosphorylierung oder durch proteolytische Veränderungen nach 3-tägiger Wiederauffütterung nicht, beziehungsweise nicht mehr vor. Die beobachteten, ernährungsbedingt hervorgerufenen Enzymaktivitäten beruhen somit ausschließlich auf einer Änderung der zellulären Enzymkonzentration. Kurzfristige Mechanismen zur Änderung der Enzymaktivität, ausgelöst durch die Nahrungsaufnahme, werden offensichtlich unter den Versuchsbedingungen nicht mehr realisiert.

Die Ergebnisse aus Abb. 5 zeigen, daß nach 3-tägiger Wiederauffütterung mit extremer Kohlenhydrat- beziehungsweise Proteindiät die in den Rattenlebern gemessenen Zyklo-AMP-Konzentrationen circadianen Schwankungen unterliegen. Die anfänglichen, vor Futterzugabe gemessenen Werte von rund 8 nMol bei den mit kohlenhydratreicher, beziehungsweise knapp 13 nMol bei den mit proteinreicher Diät gefütterten Ratten stehen in guter Übereinstimmung mit den von Trump (28) nach 3-tägiger Wiederauffütterung unter sonst identischen Bedingungen an elf Wochen alten Ratten gemessenen Ergebnissen. Aus dem 24-Stunden-Profil lassen sich gegen Ende des Fütterungsintervalls bei beiden Diäten charakteristische Anstiege des hepatozellulären Zyklo-AMP-Gehaltes verfolgen. Während bei der Proteingruppe ein rascher, nur zweistündiger Anstieg mit einem viermal so langem Abfall auf den Ausgangswert abwechselt, erfolgen bei der Vergleichsdiät Anstieg und Abfall annähernd gleich schnell. Dies bedeutet ferner, daß das Maximum bei den mit Proteindiät gefütterten Ratten zwei Stunden früher, nämlich bereits zum Zeitpunkt 2 Uhr erreicht wird.

Die Vermutung, daß Zyklo-AMP in der Leber als Vermittler der Hormonwirkung der Katecholamine eine einzigartige Rolle spielt (43), wurde nachhaltig bestätigt durch den Nachweis von Veränderungen des hepatozellulären Zyklo-AMP-Gehaltes nach künstlicher Stimulierung mit diesen Hormonen (43-48). In einigen Fällen jedoch, waren die beobachteten Schwankungen des Zyklo-AMP-Gehaltes sehr gering, gemessen an den von den Hormonen verursachten Stoffwechselwirkungen (44-46). Es wird deshalb vermutet, daß in der nicht stimulierten Zelle der Großteil des enthaltenen Zyklo-AMP in einer inaktiven Form zurückgehalten wird und nur das freie, aktive Zyklo-AMP eine physiologische Wirkung entfaltet (45). Falls nämlich die Hormone nur auf die Konzentration des freien Zyklo-AMP Einfluß ausüben, so sind diese Veränderungen bezogen auf den Gesamtgehalt sehr klein und fallen bei der Messung des Gesamtpools an Zyklo-AMP gar nicht ins Gewicht. Hinsichtlich der Beeinflussung der metabolischen Wirkung Zyklo-AMP-abhängiger Enzyme sind nach Schimmel (49) drastische Veränderungen des Zyklo-AMP-Pools nicht zwingend erforderlich. So gesehen würden die gegenüber dem Gesamtgehalt an Zyklo-AMP relativ geringen Schwankungen der freien Zyklo-AMP-Konzentrationen für eine wirksame Beeinflussung des Zyklo-AMP-induzierten Stoffwechselgeschehens ausreichen. Wie aus den Untersuchungen Trumps (28) hervorgeht, können außer diesen hormoninduzierten Schwankungen des Leber-Zyklo-AMP-Gehaltes auch diätbedingte Konzentrationsänderungen beobachtet werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Goldberg et al (50) fand er unter dem Einfluß längerfristiger extremer Kohlenhydraternährung im Vergleich mit Normaldiät gefütterten Ratten erniedrigte Zyklo-AMP-Konzentrationen.

nen in den Lebern. Der Zyκλο-AMP-Gehalt der Lebern der mit proteinreicher Diät gefütterten Ratten hingegen lag signifikant über dem der mit Normaldiät ernährten Tieren. Diese langfristige Beeinflussung des Leber-Zyκλο-AMP-Gehaltes durch Protein- und Kohlenhydratdiät findet in der vorliegenden Arbeit in den unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen seine Bestätigung. Die desweiteren nachgewiesenen tageszeitlichen Schwankungen der Zyκλο-AMP-Konzentrationen stehen in Einklang mit Befunden anderer Autoren (51, 52). Allerdings können die von Ip et al (52) und Trump (28) nach Fütterung mit Normaldiät beobachteten Zyκλο-AMP-Konzentrationen um 8 Uhr nicht bestätigt werden. In Abhängigkeit von der jeweiligen Diät erfolgt bei den mit Kohlenhydratdiät ernährten Ratten der allmähliche Anstieg bereits zum Zeitpunkt der maximalen Nahrungsaufnahme (vgl. Abb. 1 Diagramm Magengewichte), während bei der Vergleichsdiät der rasche Anstieg erst eine Stunde später einsetzt. Die gemessenen Konzentrationsanstiege lassen eine kurzfristige, ernährungsbedingte endokrine Stimulierung der Zyκλο-AMP-Produktion in der Leber als möglich erscheinen. Inwiefern der langsame Anstieg der hepatozellulären Zyκλο-AMP-Konzentration als Folgeerscheinung kohlenhydratreicher Ernährung seinerseits Einfluß auf das regulatorische Geschehen des Kohlenhydratstoffwechsels nimmt bleibt vorerst unverständlich und bedarf einer weiteren experimentellen Untersuchung. Bei exzessiver Proteinzufuhr gelangen die durch die intestinale Verdauung freigesetzten Aminosäuren mit dem Pfortaderblut in die Leber. Infolge dieses Aminosäureinfluxes kommt es vermutlich unter Weitervermittlung des Glucagonstimulus über das Adenylat-Cyclase-System zu einem Anstieg der intrazellulären Konzen-

tration von Zyklo-AMP mit gleichzeitig einhergehender vermehrter Synthese von Glukose. Die Förderung der Gluconeogenese in der Leber unter der Wirkung des Glucagons ist hinreichend bewiesen worden. Ebenso konnte gezeigt werden, daß Zyklo-AMP die Gluconeogenese stimuliert (42, 53-55). Aus neueren Untersuchungen geht hervor, daß die gluconeogenetische Wirkung des Glucagons unter anderem auf einer Zyklo-AMP-abhängigen allosterischen Aktivierung einer Proteinkinase beruht, die seinerseits durch Phosphorylierung zu einer Aktivitätssteigerung des nachgeordneten Enzyms FbPase führt (21, 41).

In der vorliegenden Arbeit konnte in den Lebern von Ratten, die nach einer 72-stündigen Fastenperiode für den gleichen Zeitraum extrem kohlenhydrat- beziehungsweise proteinreich ernährt wurden keine Korrelation zwischen dem circadianen Verhalten des Zyklo-AMP-Gehaltes und der Aktivität der FbPase gefunden werden. Trotz der bei beiden Diäten zu beobachtenden beträchtlichen Schwankungen der hepatozellulären Zyklo-AMP-Konzentration (vgl. Abb. 5) ließ sich keine tageszeitliche Änderung der Aktivität der FbPase (vgl. Abb. 2 u. 3) in den Lebern dieser extrem ernährten Tieren feststellen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, ob die nach 72-stündiger Fastenperiode und anschließender 3-tägiger Wiederauffütterung mit extrem kohlenhydrat- und proteinreicher Ernährung in früheren Arbeiten in Rattenlebern gefundenen hohen beziehungsweise niedrigen Werte an Zyκλο-AMP sowie der Enzymaktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase einer circadianen Rhythmik unterliegen. Außerdem sollte geprüft werden, ob diese ernährungsbedingten hohen beziehungsweise niedrigen Enzymaktivitäten, die auf einer Änderung der zellulären Enzymkonzentration beruhen, durch die Rhythmik der Nahrungsaufnahme noch kurzfristig verändert werden können. Weiterhin sollte geklärt werden, ob zwischen möglichen circadianen Schwankungen der Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivität und des Zyκλο-AMP-Gehaltes ein Zusammenhang besteht. Die ermittelten Untersuchungsergebnisse erlauben folgende Aussagen:

1. Die bei Substratsättigung unter $v_{\max}$ -Bedingungen gemessenen Aktivitäten der Fructose-1,6-bisphosphatase unterliegen keinen signifikanten tageszeitlichen Schwankungen.
2. Auch das Verhältnis der bei einer bestimmten vorgegebenen Substratkonzentration gemessenen Fructose-1,6-bisphosphatase-Aktivität zu der unter $v_{\max}$ -Bedingungen gemessenen Enzymaktivität läßt keine circadianen Schwankungen der Affinität des Enzyms zum Substrat erkennen.
3. Der Zyκλο-AMP-Gehalt der Leber zeigt unabhängig von der jeweils gefütterten Diät im Anschluß an die Nahrungsaufnahme einen raschen mitternächtlichen An-

stieg der Werte mit langsamem Abfall auf das Ausgangsniveau in den Morgenstunden.

4. Eine Korrelation zwischen dem circadianen Verhalten der Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase und des Zyκλο-AMP-Gehaltes konnte in den Untersuchungen nicht festgestellt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Taketa, K., B.M. Pogell. Biochem.Biophys.Res.Comm. 12, 229-35, 1963
2. Taketa, K., B.M. Pogell. J.Biol.Chem. 240, 651-62, 1965
3. Underwood, A.H., E.A. Newsholme. Biochem.J. 95, 767-74, 1965
4. Nimmo, H.G., K.F. Tipton. Eur.J.Biochem. 58, 575-85, 1975
5. Hers, H.G., E. Eggermont. In: Fructose-1,6-diphosphatase and its Role in Gluconeogenesis. McGilvery, R.W., B.M. Pogell eds. 14-9, Washington, 1964
6. Datta, A.G., A.T. Sasaki, J.W.O. Van Den Berg, S. Pontremoli, B.L. Horecker. Arch.Biochem.Biophys. 165, 641-45, 1974
7. Nimmo, H.G., K.F. Tipton. Biochem.J. 145, 323-34, 1975
8. Carlson, C.W., G.A. Tejwani, R.C. Baxter, E.H. Ulm, B.M. Pogell. J.Biol.Chem. 250, 4996-5002, 1975
9. Weber, G., R.L. Singhal, N.B. Stamm, E.A. Fisher, M.A. Mentendiek. Adv.Enz.Regul. 2, 1-38, 1964
10. Weber, G., R.L. Singhal, S.K. Srivastava. Proc.Natl. Acad.Sci. USA 53, 96-104, 1965
11. Weber, G., R.L. Singhal, N.B. Stamm, S.K. Srivastava. Fed.Proc. 24, 745-54, 1965
12. Freedland, R.A., T.L. Cunliffe, J.G. Zinkl. J.Biol. Chem. 241, 5448-51, 1966
13. Stifel, F.B., O.D. Taunton, H.L. Greene, R.H. Herman.

- J.Biol.Chem. 249, 7240-4, 1974
14. Taunton, O.D., F.B. Stifel, H.L. Greene, R.H. Herman. J.Biol.Chem. 249, 7228-39, 1974
15. Szepesi, B., R.A. Freedland. Can.J.Biochem. 49, 108-18, 1971
16. Start, C., E.A. Newsholme. FEBS Lett. 6, 171-3, 1970
17. Goldberg, A. J.Nutr. 101, 693-8, 1971
18. Pontremoli, S., E. Melloni, F. Salamino, A. De Flora, B.L. Horecker. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71, 1776-9, 1974
19. Huibrigtse, C.A., R.A. Brunsvold, P.D. Ray. Biochim.Biophys.Acta 421, 228-36, 1976
20. Stifel, F.B., H.L. Greene, E.G. Lufkin, M.R. Wensch, L. Hagler, R.H. Herman. Biochim.Biophys. Acta. 428, 633-8, 1976
21. Riou, J.P., T.H. Claus, D.A. Flockhart, J.D. Corbin, S.J. Pilgis. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 4615-9, 1977
22. Sutherland. E.W., G.A. Robinson, R.W. Butcher. Circulation 37, 279-306, 1968
23. Pedrosa, F.O., S. Pontremoli, B.L. Horecker. Proc. Natl.Acad.Sci. USA 74, 2742-45, 1977
24. Weigand, W. Dissertation, Fachbereich Naturwissenschaften der Universität Erlangen-Nürnberg, 1978
25. Traniello, S., E. Melloni, S. Pontremoli, C.L. Sia, B.L. Horecker. Arch.Biochem.Biophys. 149, 222-31, 1972

26. Gilman, A.G. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 67, 305, 1970
27. Tovey, K.C., K.G. Oldham, J.A.M. Whelan. Clinica Chimica Acta 56, 221-41, 1974
28. Trump, G.T. Dissertation, Fachbereich Medizin der Universität Erlangen-Nürnberg, 1978
29. Edwards, P.A., R.G. Gould. J.Biol.Chem. 249, 2891-96, 1974
30. Nakagawa, H., K. Nagai. Biochem.J. 69, 923-34, 1971
31. Suda, M., K. Nagai, H. Nakagawa. Biochem.J. 73, 727-38, 1973
32. Hannappel, E. Dissertation, Fachbereich Naturwissenschaften der Universität Erlangen-Nürnberg, 1978
33. Firmenprospekt der Firma Altromin, Lange Str. 40, 4937 Lage
34. Zahlmann, L. Dissertation, Fachbereich Medizin der Universität Erlangen-Nürnberg, vorgelegt im Oktober 1979
35. Schimke, R.T. J.Biol.Chem. 237, 459-68, 1962
36. Freedland, R.A., C.H. Sodikoff. Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 109, 394-96, 1962
37. Freedland, R.A., B. Szepesi. In: Enzyme Synthesis and Degradation in Mammalian Systems. Rechcigl, M.Jr.ed. 103-40. Basel, Karger 1971
38. Burnette, M.A., M.J. Babcock. J.Nutr. 108, 458-64, 1978
39. Pontremoli, S., A. De Flora, F. Salamino, E. Melloni, B.L. Horecker. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72, 2969-73, 1975

40. Pontremoli, S., E. Melloni, F. Salamino, A. De Flora, B.L. Horecker. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71, 1776-79, 1974
41. Chatterjee, T., A.G. Datta. Biochem.Biophys.Res. Comm. 84, 950-56, 1978
42. Clark, M.G., N.M. Kneer, A.L. Bosch, H.A. Lardy. J.Biol.Chem. 249, 5695-703, 1974
43. Robinson, G.A., R.W. Butcher, E.W. Sutherland. In: Cyclic AMP. Academic Press, NY., 1971
44. Exton, J.H., G.A. Robinson, E.W. Sutherland, C.R. Park. J.Biol.Chem. 246, 6166, 1971
45. Exton, J.H., C.R. Park. In: Handbook of Physiology. Greep, R.O. and Astwood, E.B. eds. Section 7, Vol. 1, 437. American Physiolog. Soc., Washington, D.C., 1972
46. Jefferson, L.S., J.H. Exton, R.W. Butcher, E.W. Sutherland, C.R. Park. J.Biol.Chem. 243, 1031, 1968
47. Pilakis, S.J., T.H. Claus, R.A. Johnson, C.R. Park. J.Biol.Chem. 250, 6328, 1975
48. Butcher, F.T., V.R. Potter. Cancer Res. 32, 2141, 1972
49. Schimmel, R.J. Endocrinology. 94, 1372-80, 1974
50. Goldberg, M.L., G.B. Claude. Biochim.Biophys.Acta. 454, 457-68, 1976
51. Lee, S.C., J.K. Tews, M.L. Morris, A.E. Harper. J.Nutr. 102, 319, 1972
52. Ip, M.M., C. Ip, H.M. Tepperman, J. Tepperman. J. Nutr. 107, 746-57, 1977
53. Blair, J.B., D.E. Cook, H.A. Lardy. J.Biol.Chem.

248, 3601-7, 1973

54. Rognstad, R. Biochem.Biophys.Res.Comm. 63, 900-5,
1975

55. Johnson, M.E.M., N.M. Das, F.R. Butcher, J.N. Fain.
J.Biol.Chem. 247, 3229-35, 1972

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Brand für die Überlassung des Themas sowie für seine ständige Betreuung und Förderung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für ihre allzeit freundliche Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten. Insbesondere den Herren Dr. W. Weigand und Dr. E. Hannappel, wie auch Frl. Ostermann sei für ihre kooperative Hilfe mein herzlichster Dank ausgesprochen. Dank geht nicht zuletzt auch an meinen Kollegen L. Zahlmann für die überaus gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Am 11.7.1954 wurde ich als Sohn der Eheleute Hans und Anneliese Zimmermann, geb. Maderer in Sulzbach-Rosenberg geboren. Im September 1960 trat ich in die Volksschule Sulzbach-Rosenberg ein, von der ich nach Beendigung des sechsten Schuljahres in die Staatliche Realschule Sulzbach-Rosenberg überwechselte. Nachdem ich im Jahr 1970 das Zeugnis der Mittleren Reife erhielt, setzte ich meine schulische Ausbildung mit dem Besuch des naturwissenschaftlichen Gymnasiums Sulzbach-Rosenberg fort, wo ich im Juni 1973 die Reifeprüfung ablegte. Nach Ableisten meines Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr immatrikulierte ich mich im Wintersemester 1974 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen. Im Sommersemester 1975 begann ich das Studium der Zahnmedizin und bestand im Sommer 1977 das Physikum. Im Juli 1980 beendete ich mein Studium mit dem erfolgreichen Abschluß des Staatsexamens.

Copy - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197